

Anticuerpos policlonales, método de preparación y uso de los mismos.

La presente invención se refiere a anticuerpos  
5 policlonales que reconocen específicamente y con gran afinidad a los dos péptidos amiloides más importantes, el A $\beta$ 40 y el A $\beta$ 42, así como a su empleo en la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos  
10 de la enfermedad de Alzheimer como de fármacos inhibidores de su formación. Del mismo modo, pueden ser útiles para la valoración de la actividad de las enzimas implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de  
15 las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, así como de la valoración del nivel de expresión de los genes implicados en toda la maquinaria de eventos que conducen al depósito y formación de placas amiloides, lesiones características de los cerebros de pacientes  
20 que sufren la enfermedad de Alzheimer.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Se conocen determinados factores acerca de los  
25 fenómenos bioquímicos y metabólicos asociados a la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Dos cambios morfológicos e histopatológicos observados en cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer son marañas neurofibrilares (MNF) y depósitos  
30 amiloides.

Las marañas neurofibrilares intraneuronales están también presentes en otras enfermedades degenerativas, pero la presencia de depósitos de amiloide tanto en los  
35 espacios interneuronales (placas neuríticas) como

en la microvasculatura circundante (placas vasculares) parece ser característica del Alzheimer. De éstas, las placas neuríticas parecen ser las más características (Price, D.L. y col. , Drug Development Research (1985) 5:59-68).

El componente principal de estas placas amiloides es un péptido de 40-42 aminoácidos denominado péptido amiloide A $\beta$ 4.

10

El péptido amiloide A $\beta$ 4 es un polipéptido originado por proteólisis a partir de unas glucoproteínas de membrana denominadas proteínas precursoras del péptido amiloide A $\beta$ 4 ( $\beta$ APP). Estando estas proteínas precursoras del péptido amiloide constituidas por 695 a 770 aminoácidos, siendo todas ellas producidas por el mismo gen.

Se han identificado dos variantes principales del péptido amiloide A $\beta$ 4, el péptido A $\beta$ 40 y el A $\beta$ 42, de 40 y 42 aminoácidos respectivamente, que presentan una distribución tisular diferente en condiciones tanto fisiológicas como patológicas.

Nosotros hemos clonado y secuenciado el gen de la  $\beta$ APP en el pollo y hemos demostrado que es prácticamente idéntico al gen humano, pues produce  $\beta$ APPs con una enorme homología, del orden del 95%, a las de la especie humana, y el péptido A $\beta$ 4, característico de la enfermedad de Alzheimer, es idéntico al humano. Además, el embrión de pollo procesa a las  $\beta$ APPs de tal forma que se produce péptido A $\beta$ 4, debido a la acción de unas enzimas proteolíticas que provocan la proteólisis de las  $\beta$ APPs en un sitio clave para producir A $\beta$ 4, la enzima proteolítica que corta las  $\beta$ APPs para producir

A $\beta$ 4 es denominada  $\beta$ -secretasa.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- 5 La presente invención proporciona anticuerpos policlonales, capaces de reconocer específicamente mediante cualquier técnica inmunológica convencional (western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, ...) de la presencia de los péptidos
- 10 amiloides A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, obtenidos por inmunización de mamíferos, preferiblemente conejos, con una proteína conjugada con un péptido seleccionado a partir de un grupo que consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, opcionalmente acortados por
- 15 eliminación de los restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-terminal, y opcionalmente alargados por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína.
- 20 En una realización particular, el péptido corresponde a SEQ ID NO 1, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 2, opcionalmente alargado por
- 25 adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 3, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. En
- 30 otra realización particular el péptido corresponde a SEQ ID NO 4, opcionalmente alargado por adición de los restos de aminoácido apropiados para conjugar la proteína. Aunque la eliminación de los restos aminoacídicos terminales no elimina la actividad
- 35 específica, los péptidos preferidos son los de SEQ ID

NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

La provisión de cualquiera de los péptidos,  
substantialmente puros, antes mencionados es también  
5 parte de la presente invención.

Esta invención también proporciona un método para la  
obtención de los anticuerpos policlonales antes  
mencionados por inmunización de mamíferos,  
10 preferiblemente conejos, con una proteína conjugada a  
un péptido seleccionado a partir de un grupo que  
consiste en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ  
ID NO 4, opcionalmente acortados por eliminación de los  
restos de aminoácido de los extremos N-terminal y/o C-  
15 terminal, y opcionalmente alargados por adición de los  
restos de aminoácido apropiados para conjugar la  
proteína.

Según una forma de realización preferida de realización  
20 de la presente invención, la proteína utilizada para su  
conjugación con el péptido es la hemocianina de lapa  
(KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin en inglés).

En una realización aún más preferida de la presente  
25 invención, los mamíferos utilizados, para su  
inmunización con la proteína conjugada al péptido, son  
conejos.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se  
30 proporciona un nuevo método para la valoración tanto de  
fármacos activadores de la degradación de los péptidos  
amiloides característicos de la enfermedad de  
Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su  
producción, mediante el uso de los anticuerpos  
35 policlonales descritos anteriormente.

Del mismo modo, el método sirve también para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos.

Esta invención también proporciona un método para la detección de la presencia o ausencia de los péptidos amiloides A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 en una muestra, empleando el embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

Según una realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para la valoración tanto de fármacos activadores de la degradación de los péptidos amiloides característicos de la enfermedad de Alzheimer, como de fármacos inhibidores de su producción, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

De acuerdo con otra realización preferida de la presente invención, se proporciona un nuevo método para valorar la actividad de las enzimas (proteasas) implicadas en el procesamiento de la proteína precursora de los citados péptidos o la actividad de las enzimas implicadas en la degradación de los mismos, mediante el uso del embrión del pollo o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios del huevo embrionado del pollo, como modelo animal de ensayo.

El método consiste en la inoculación del fármaco en el huevo embrionado del pollo, ya por simple goteo sobre

el propio embrión o alguna de sus membranas, ya por inyección en el vitelo ( si el embrión es joven ) o saco vitelino ( si el embrión es más mayor ), en el saco amniótico, en el saco alantoideo ( en embriones de  
5 más de 6 días de incubación ) o en el interior del propio embrión y, tras el tiempo adecuado de incubación, se extrae el embrión y/o cualquiera de las membranas o líquidos extraembrionarios y se analiza la cantidad de péptidos amiloides, característicos de la  
10 enfermedad de Alzheimer, mediante las técnicas convencionales de laboratorio para la cuantificación de péptidos y proteínas como western blot, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación , ELISA, RIA, HPLC, etc.

15

## EJEMPLOS

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

20

## Ejemplo 1.

Acoplamiento de los péptidos a hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin)

25 Los péptidos fueron acoplados a la proteína hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin), vía n-terminus, utilizando el agente acoplante glutaraldehído. Para lo cual se activó la proteína KLH en solución de buffer borato pH 10. A continuación se  
30 añadió el péptido sintético y lentamente se añadió la solución de glutaraldehído 0.3% mientras se agitaba a temperatura ambiente. Tras la adicción de glicina 1M para bloquear el glutaraldehído no reaccionante, se dializó el conjugado péptido-proteína frente a 3 litros  
35 de buffer borato pH 8.5 a temperatura de 4 °C. El

conjugado péptido-KLH se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 2.

Generación de los anticuerpos policlonales.

- 5 Los cuatro anticuerpos policlonales fueron generados por inmunización de conejos New Zealand White contra los cuatro péptidos acoplados a KLH que se utilizaron como inmunógeno.
- 10 Cada inmunógeno se inyectó en dos conejos, realizándose cinco inyecciones: la primera inyección intradérmica del conjugado péptido-KLH en PBS y emulsionados en adyuvante completo de Freund y cuatro más intramusculares, a modo de dosis de recuerdo en los
- 15 días 14, 28, 49 y 80, del mismo conjugado péptido-KLH en PBS pero esta vez emulsionados en adyuvante incompleto de Freund, realizándose la sangría de control a los 90 días para detectar la presencia de los anticuerpos.

20

Ejemplo 3.

Purificación de los anticuerpos por afinidad.

- Tras la recogida de sangre, se separó el suero y se
- 25 prepurificó mediante desalado y posteriormente se purificaron los anticuerpos por afinidad en una matriz compuesta por 1,5 ml de material EMD-Epoxy activated (Merck) a la que se añadió 5mg del correspondiente péptido. Las fracciones purificadas se estabilizaron en
- 30 0.1% de BSA (Sigma) y se conservaron a 4 °C, pudiéndose añadir glicerol 20-50% como crioprotector.

Ejemplo 4.

Titulación del anticuerpo por ELISA.

35

Tras la purificación por afinidad se determinó el título del anticuerpo por ELISA. Para ello se puso el antígeno en una placa ELISA Maxi Sorb de Nunc a razón de 50ng/50µl en PBS pH 7, y se detectó el anticuerpo con anti-IgG de burro conjugada con fosfatasa alcalina, utilizando como sustrato p-nitrofenil fosfato (PNPP) en dietanolamina con 5mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.6 y revelado a las 2 horas.

- 10 En conclusión, los anticuerpos se generaron empleando los diferentes péptidos sintéticos descritos anteriormente acoplados a KLH. Estos péptidos sintéticos contienen un número muy pequeño de aminoácidos, lo cual les hace muy adecuados para la producción en cadena de anticuerpos homogéneos, con epítomos predefinidos.

Lista de secuencias.

- 20 SEQ ID NO 1 LVFFAEDV  
SEQ ID NO 2 GLMVGGVV  
SEQ ID NO 3 GLMVGGVVIA  
SEQ ID NO 4 RHDSGYEVHHQK

- 25 En esta solicitud los aminoácidos se abrevian utilizando los códigos de una letra aceptados en el campo, en la forma que se muestra a continuación:

- A= Ala= alanina,  
30 C= Cys= cisteína,  
D= Asp= ácido aspártico,  
E= Glu= ácido glutámico,  
F= Phe= fenilalanina,  
G= Gly= glicina,  
35 H= His= histidina,



I= Ile= isoleucina,  
K= Lys= lisina,  
L= Leu= leucina,  
M= Met= metionina,  
5 N= Asn= asparagina,  
P= Pro= prolina  
Q= Gln= glutamina,  
R= Arg= arginina,  
S= Ser= serina,  
10 T= Thr= treonina,  
V= Val= valina,  
W= Trp= triptofano,  
Y= Tyr= tirosina,

15 La información relativa a la identificación de las  
secuencias peptídicas, descritas en la presente  
invención, que se acompaña a la presente memoria en  
formato legible por ordenador, es idéntica al listado  
de secuencias que se presenta acompañando a la memoria.

20

NUMERO DE SECUENCIAS: 4

## INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 1:

## CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

25

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

## DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

30

SEQ ID NO 1

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val

1

5

## INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 2:

35

## CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

10

LONGITUD: 8

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

5 DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 2

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val

1

5

10 INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 3:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 10

TIPO: aminoácido

TIPO DE MOLECULA: péptido

15 FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 3

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

1

5

10

20

INFORMACION SOBRE LA SECUENCIA 4:

CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 12

TIPO: aminoácido

25 TIPO DE MOLECULA: péptido

FUENTE: Síntesis Química

DESCRIPCION DE LA SECUENCIA:

SEQ ID NO 4

Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys

30 1

5

10